

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2001-316282

(43)Date of publication of application : 13.11.2001

(51)Int.Cl.

A61K 38/00  
A61K 9/52  
A61K 38/22  
A61K 47/42  
A61P 43/00  
C07K 14/17  
C07K 14/52

(21)Application number : 2000-138332

(71)Applicant : SHIMIZU YOSHIHIKO  
TAPIKKU:KK

(22)Date of filing : 11.05.2000

(72)Inventor : TABATA YASUHIKO  
SHIMIZU YOSHIHIKO  
NAKAMURA TATSUO  
UEDA HIROKI**(54) FORMED COLLAGEN CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE AND METHOD FOR PRODUCING THE FORMED COLLAGEN**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a formed collagen capable of releasing a physiologically active peptide at a controlled rate, supplying a prescribed amount of the peptide at the regeneration site of a biotissue for a prescribed period and having no adverse effect on the tissue regeneration, and to provide a method for the production of the formed collagen.

**SOLUTION:** The formed collagen for releasing a physiologically active peptide at a controlled rate contains a physiologically active peptide in a water-insoluble collagen.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-316282  
(P2001-316282A)

(43) 公開日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 9/52	4 C 0 7 6
9/52		47/42	4 C 0 8 4
38/22		A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 H 0 4 5
47/42		C 0 7 K 14/17	
A 6 1 P 43/00	1 0 5	14/52	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-138332(P2000-138332)

(22) 出願日 平成12年5月11日 (2000. 5. 11)

(71) 出願人 591101825  
清水 慶彦  
京都府宇治市木幡御蔵山39-676  
(71) 出願人 597095474  
株式会社タビック  
東京都港区虎ノ門1丁目22番12号  
(72) 発明者 田畑 泰彦  
京都府宇治市琵琶台3-8-16  
(72) 発明者 清水 慶彦  
京都府宇治市木幡御蔵山39-676  
(74) 代理人 100078662  
弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性ペプチド含有コラーゲン成形体及びその製法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、生体組織の再生部位に所望の期間、所望量の生理活性ペプチドを供給することができ、しかも組織再生に悪影響を及ぼさない生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 水不溶性のコラーゲン体中に生理活性ペプチドを含有してなる生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 水不溶性のコラーゲン体中に生理活性ペプチドを含有してなる生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体。

【請求項2】 前記のコラーゲン体が架橋されたコラーゲンからなるものである、請求項1に記載の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体。

【請求項3】 前記のコラーゲン体が、bFGF含有コラーゲン体をPBSへ投入後5時間経過時点において少なくとも75%のbFGF残存率を示すものである、請求項2に記載の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体。

【請求項4】 前記の生理活性ペプチドが、細胞増殖因子より選択される少なくとも1種である、請求項1～3の何れか1に記載の生理活性ペプチド含有コラーゲン成形体。

【請求項5】 生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体の製造方法であって、アテロコラーゲンを原料として調製した架橋コラーゲン成形体又は架橋コラーゲンを生理活性ペプチドを含む水溶液と接触させることを特徴とする方法。

【請求項6】 生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体の製造方法であって、アテロコラーゲンと生理活性ペプチドの混合水溶液を架橋することを特徴とする方法。

【請求項7】 前記の生理活性ペプチドが、細胞増殖因子より選択される少なくとも1種である、請求項5又は6に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ペプチドの徐放性を有するコラーゲン成形体及びその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】生体組織に大きな損傷あるいは欠損が生じた場合、細胞を利用することによって組織の再生あるいは代替をするという新しい医療が再生医工学（tissue engineering）である。この再生医工学のキー・ポイントは、いかにうまく細胞を増殖・分化させる環境を組織の再生部位に作り出すかである。そのためには、細胞の足場となるマトリックス、及び種々の生理活性ペプチドの助けが不可欠である。近年の分子生物学、生物医学の進歩により、生理活性ペプチドの働きが明らかになり、また、これらの生理活性ペプチドが大量に供給されるようになった。これにより、生理活性ペプチドを用いた再生医工学が可能となりつつある。しかしながら、これらの生理活性ペプチドを、ただ単に、再生させたい部位に加えるだけでは、その生理活性は期待できない。これは主に、生理活性ペプチドが添加部位から拡散し、その場にほとんど留まっていないからである。そこで、生理活性ペプチドを必要な量、必要な期間、とどめておく工夫

が必要となる。この工夫の1つに徐放化がある。

【0003】その方法論の一つとして、生体吸収性高分子担体及び生分解性のハイドロゲル担体からのタンパク質を含む生理活性ペプチド薬物の徐放に関する報告（例えば、瀬崎 仁編集、医薬品の開発、第13巻、薬物送達法、廣川書店、1988年など）があり、例えば、代表的な生体内分解吸収性高分子であるグリコール酸-乳酸共重合体などの高分子材料と薬物とを混合し、薬物を徐放する試みが報告されている。しかし、これらの高分子が油性であるため、相溶性の不足から、水溶性の薬物の徐放化には問題があった。すなわち、溶解性のことなる薬物と担体材料とを均一に混合するために超音波照射あるいは有機溶媒などの利用が試みられているが、これらの混合プロセスが、ペプチドあるいはタンパク質の生理活性の低下、消失の原因となっている。

【0004】その解決策として、生体内にて分解吸収される高分子ハイドロゲルを薬物徐放用マトリックスとして利用しようという試みが報告されている（例えば、Gombotz, W.R. など、Bioconjugate Chem., 6巻, p332, 1995など）。徐放化したい生理活性ペプチドを含んだ状態で水溶性の天然高分子を架橋し、ハイドロゲルを作製するもので、該ハイドロゲルの架橋の程度によって生理活性ペプチドの徐放性をコントロールする。しかしながら、このシステムでは、生理活性ペプチドの徐放はハイドロゲル内でのそれらの物質自身の拡散性のみによって決定されていることから、生理活性ペプチドの徐放期間を広範囲に変化させることはできない。また、この方法では、ハイドロゲルの架橋度をいかに高くしても、長期間にわたる生理活性ペプチドの徐放化は現実的に不可能である。

【0005】再生医工学分野における生理活性ペプチドの徐放化では、再生したい組織の種類にもよるが、最低1～2週間程度の徐放化が必要である。その方法論の一つとして、ハイドロキシアパタイトなどのセラミックス表面に生理活性ペプチドを吸着させ、その脱着によって生理活性ペプチドの徐放を行なわせる報告がある（例えば、Ono, I. など、Plast. Reconstr. Surg., 90巻, p870-879, 1992など）。この方法では、1～2週間の徐放化は可能であるが、徐放化担体が生体吸収性ではなく、徐放という目的を完了した後でも、該担体は体内に残存し、これが組織再生を物理的に阻害することになる。この点が生理活性ペプチドの徐放担体として問題となる。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体組織の再生部位に所望の期間、所望量の生理活性ペプチドを供給することができ、しかも組織再生に悪影響を及ぼさない生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体及びその製造方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

に鑑みて鋭意研究を行った結果、生理活性ペプチドと水不溶性のコラーゲンを複合化して安定な複合体を作ることにより、体内での生理活性ペプチドの分解を抑制できること、所望の部位での持続的な生理活性ペプチドの放出が可能なことを見出して本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体であって、水不溶性のコラーゲン体中に生理活性ペプチド含有することを特徴とする。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明において、コラーゲン成形体に含め得る生理活性ペプチドとしては、特に限定されないが、その使用が再生医工学のために有効な効果をもたらすものが好ましく、当該コラーゲン成形体の使用目的に応じて適宜選択される。具体的には、細胞増殖因子、例えば血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、塩基性及び酸性線維芽細胞増殖因子(FGF)、トランスホーミング増殖因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血小板由来細胞増殖因子(PDGF)、インシュリン様増殖因子(IGF)、骨形成因子(BMP)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、神経成長因子(NGF)、神経栄養因子(NTF)、上皮増殖因子(EGF)などが挙げられる。所望により2種以上の生理活性ペプチドを当該コラーゲン成形体に含めることもできる。尚、細胞増殖因子に加え、サイトカイン類、インターロイキン類、ペプチドホルモン、スーパーオキシドデムスターゼ、治療用プロテアーゼなども好適に使用され得る。

【0010】コラーゲンは、生体構成タンパク質の1/3を占める生体の主要タンパク質であり、それ自身が本来、種々の生理活性ペプチドと相互作用している。例えば、ある種の細胞増殖因子がコラーゲンと分子間力を介して相互作用していることが報告されている(例えば、Schuppan, D. など、Gastroenterology., 114巻, P139, 1998など)。その相互作用には、静電的、疎水性、水素結合性など種々のものが考えられ、生理活性ペプチドとコラーゲンとの組み合わせによって、それらの相互作用の強さ、割合は異なっている。これらの相互作用によって、生理活性ペプチドと担体としてのコラーゲンとは物理的に結合し、安定な生理活性ペプチド含有コラーゲン成形体が形成される。成形体形成の際の条件、例えば、濃度、イオン強度、凍結乾燥処理などによって、コラーゲンと生理活性ペプチドとの結合力が増し、より安定した生理活性ペプチド含有コラーゲン成形体を形成することができる。

【0011】更に、本発明においては、水不溶性のコラーゲンをを用いる。可溶化の方法(酸処理、アルカリ処理、酵素処理がある)によってはコラーゲンも水溶性であるので、得られる生理活性ペプチド含有コラーゲン成形体も水溶性となり、生体に投与した際、一過性に生理活性ペプチドが当該成形体から放出されてしまい、安定

した徐放化は困難となる。そこで、本発明では、水不溶性のコラーゲンをを用いることにより、その生体内での分解性に応じて生理活性ペプチドの徐放速度を制御することを可能とした。本発明において使用される水不溶性のコラーゲンとしては、好ましくは、架橋処理により水不溶化を行った含水率85~99%のコラーゲンハイドロゲルである。

【0012】用いるコラーゲンとしては、その出発原料となる動物種、組織部位、年齢に関係なく、いずれのものでもよく、また、その抽出方法、精製法にも依存しない。コラーゲンには十数種類のタイプがあるが、本発明に用いるコラーゲンとしては、架橋処理により水不溶化が可能であればいずれのタイプでもあるいはそれらの混合物でも適用できるが、好ましくは、タイプI、あるいは、III、IVなどのコラーゲンがよい。

【0013】コラーゲンの架橋は、従来公知の方法に従って行うことができる。具体的には化学架橋剤を使用する方法、熱処理あるいは紫外線を照射によって架橋する方法等が挙げられる。例えば、担体としてのコラーゲン成形体がコラーゲンスポンジの場合には次のようにして架橋を行えばよい。1. コラーゲン水溶液(0.3重量%程度が好ましい)をホモジナイザーを用いて泡立たせ、凍結する。2. これを凍結乾燥することによってコラーゲンスポンジを得る。3. この未架橋コラーゲンスポンジを化学架橋剤にて処理、あるいは熱、紫外線処理を行うことによって架橋する。

【0014】架橋剤は、使用するコラーゲンの種類により適宜好適なものが選択されるが、通常、ホルマリン、グルタルアルデヒド、水溶性カルボジイミド〔1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート等〕、エピクロロヒドリン、ジエポキシ化合物〔ビスエポキシジエチレングリコール、1,4-ビス-(2,3-エポキシプロポキシブタン)等〕の架橋剤が用いられる。架橋剤の濃度は $10^{-3}$ ~10重量%、好ましくは $10^{-2}$ ~1重量%であり、4~40℃、好ましくは25~30℃で、3~48時間、好ましくは12~24時間、該未架橋コラーゲンスポンジと該架橋剤溶液と接触させる。

【0015】熱で架橋する場合は、該未架橋コラーゲンスポンジを減圧下(好ましくは10mmHg程度)、110~160℃、好ましくは120~150℃の雰囲気中に、通常1~48時間、好ましくは6~24時間放置することによって行う。

【0016】また、紫外線により架橋する場合は、該未架橋コラーゲンスポンジを殺菌ランプの下に置いて、通常、室温、好ましくは0~40℃で6~48時間放置することによって行なう。

【0017】使用するコラーゲンは、溶解性、安定性及

び膨潤性等の物性あるいはタイプの異なるコラーゲンを混合して用いてもよい。一方、調製した架橋コラーゲンは単一あるいは必要に応じて物性の異なるものを混合してもよい。

【0018】本発明において、水不溶性のコラーゲン体中に生理活性ペプチドを含有してなる生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体は、前記の生理活性ペプチドと水不溶性のコラーゲンを混合することにより簡単に調製することができる。より具体的には、コラーゲンの0.3～10重量%水溶液に直接架橋剤を添加して調製した架橋コラーゲン、あるいは架橋剤溶液にコラーゲンを浸漬して調製した架橋コラーゲンを直接、生理活性ペプチドを含む水溶液中に浸漬するか、あるいは架橋コラーゲンを乾燥した後、それを生理活性ペプチド水溶液中で再膨潤させることによって調製できる。また、生理活性ペプチドとコラーゲンとの混合水溶液を架橋することによっても調製できる。

【0019】該コラーゲン成形体には、該コラーゲン成形体の安定性や生理活性ペプチドの放出持続性、放出された生理活性ペプチドの機能発現等の目的に応じ、所望により、他の成分を加えることもできる。例えば単糖アミノ酸あるいはその高分子量体や、種々のアミノ酸あるいはその高分子量体、多糖、無機塩類等が挙げられる。

【0020】本発明のコラーゲン成形体に含有された生理活性ペプチドは、後述するように、水不溶性のコラーゲン体が生体内で酵素にて分解されるに従って、該成形体外部へと徐々に放出される。この放出速度は、該成形体中における生理活性ペプチドと担体としてのコラーゲン体との物理結合の強さ、その生体内安定性にも関連しているが、使用するコラーゲンの生分解性の程度（例えば当該コラーゲンの含水率等によっても影響を受ける）によりその放出速度を制御することができる。

【0021】得られた架橋コラーゲンが所望の水不溶性を有したものか否か、そして生理活性ペプチドが所望の形態にて該コラーゲン成形体中に含有せしめられているのかを簡単に判定する方法としては、bFGF 100  $\mu$ gを含浸させたコラーゲン成形体2mgを37℃のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）5cc中に投入し、投入後、所定の経過時間毎の該コラーゲン成形体中の残存bFGFの残存量を調べる方法が例示される。もし、所定の経過時間後のbFGFの残存量が所定のレベルに落ち着けば、該コラーゲン成形体は所望の水不溶性を有し、しかも該生理活性ペプチドは所望の形態にて含有せしめられている、と判定される。bFGFがコラーゲンと相互作用をしているならば、所望の水不溶性を有するコラーゲンが水可溶性とならない in vitro 条件においては、PBSとの接触初期に該コラーゲン成形体に形成される水路を介したbFGFの溶出（以下、初期溶出という）以外起らないからである。因みに、bFGFの残存量の所定のレベルは、好ましくは、5時間経過時点で75%以

上、特に好ましくは、5時間経過時点で80%以上、最も好ましくは85%以上である。

【0022】本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体は、任意の方法で生体に投与することができるが、目的とする特定部位での生理活性ペプチドの持続的な放出のためには非経口的な投与が特に好ましい。更に、必要に応じ、当該成形体に、製剤上許容し得るならば更なる物質（例えば、安定剤、保存剤、可溶化剤、pH調製剤、増粘剤等）や徐放効果を調節し得る各種添加剤（例えば、生理活性ペプチド安定化剤、凝集防止剤、脂溶性向上剤、生理活性ペプチドとコラーゲンとの結合剤等）を混合してもよい。尚、これらの物質は公知のものが使用できる。

【0023】本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体は、目的に応じて種々の形状の製剤化が可能である。例えば、粒状、円・角柱状、シート状、ディスク状、ペースト状等の固形（コラーゲン体の内部構造がスポンジ状あるいは均一で緻密なものいづれでもよい）、半固形製剤、あるいは懸濁剤や乳剤等の注射剤等が挙げられる。好ましくは、目的とする特定部位での徐放効果に優れた固形製剤である。

【0024】注射剤は、筋肉内、静脈内、胸腔内、腹腔内、骨髓内、皮下、皮内等の種々の部位に投与され得、好ましくは生体組織を再生する部位あるいはその近傍に投与される。

【0025】固形、半固形製剤の場合は、生理活性ペプチドの放出を期待する部位に直接埋め込む方法、ペースト状製剤を注射器にて注入する方法、粒子状製剤を生理食塩水又はPBSに懸濁させた上で懸濁注射により注入する方法等が挙げられる。

【0026】本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体の製剤化においては、除菌濾過等の無菌化工程を経ることが更に望ましい。

【0027】尚、担体としてのコラーゲン体と同様の機能を有するコラーゲン体からなる人工器官（例えば、人工血管、人工食道、人工気管、人工消化管、人工神経管—いづれも欠損部を補填し、自己組織を再生させるためのもの—等が挙げられる）に用いる場合には、該コラーゲン体を担体として利用できる。例えば、人工神経管に適用する場合には、その内腔に配されるコラーゲンスポンジ又は管を構成するコラーゲン体に生理活性ペプチドの水溶液を含浸させればよい（具体的には、注入後、所定時間放置。このように本発明の生理活性ペプチド含有コラーゲン複合体は、生体への適用の前に、別途準備されたコラーゲン成形体に生理活性ペプチドを含有せしめることによって得てもよい）。ここで、該生理活性ペプチドを含有せしめられた人工神経管を凍結乾燥すれば、冷蔵保存が可能となる。

【0028】本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体の、動物、特に人に投与される用量は、目的の

生理活性ペプチド、使用される製剤の形状、投与方法及び治療される特定部位によって変化する。しかしながら、その投与量は治療的応答をもたらすに十分であるべきである。

#### 【0029】

【実施例】以下、一実施態様に基づき本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0030】例1

0.1 M塩酸水溶液により溶液のpHを3に調節した蒸留水(500ml)中へ、5gの凍結乾燥コラーゲン(日本ハム製、ブタ皮膚由来、酵素可溶化抽出物)を加え、振とうした。この水溶液を、pHを調節しながら冷蔵庫内で約1週間静置することによって溶解し、1重量%コラーゲン水溶液を得た。得られたコラーゲン水溶液50mlを、氷冷下、スクリュウ型ホモジナイザーを用いて約7,000rpm、15分間攪拌し、泡立てた。これを容器に流し込み(in vivo徐放試験及び in vivo 分解試験用にはポリスチレン製96穴プレートの各wellに100 $\mu$ l。ウサギ頭蓋骨再生実験用にはポリプロピレン製、10.9cm $\times$ 7.3cmの型に15ml。)、直ちに-80℃の冷凍庫に入れて、該起泡コラーゲン水溶液を冷凍し(水を凍結させるためであり、通常、2時間以上入れておけばよい)、一晩凍結乾燥した。凍結乾燥コラーゲンスポンジを減圧(10 mmHg)下、1, 3, 12, 24及び48時間、140℃の条件で熱架橋処理を行った。

#### 【0031】例2

蒸留水で5倍に希釈した<sup>125</sup>I 標識ヒト遺伝子組み替え型TGF- $\beta$ 1(NEN社製)水溶液を、例1にて作製した各コラーゲンスポンジ試料(約1mg、直径6mm、厚さ3mm、EOG滅菌済み)に10 $\mu$ lずつ滴下した。この操作は、10cm直径のプラスチックシャーレ内で行った。シャーレのフタを閉じ、パラフィルムで密閉後、4℃で一晩、放置することによって<sup>125</sup>I 標識TGF- $\beta$ 1水溶液をコラーゲンスポンジ内に含浸させた。これらの<sup>125</sup>I 標識TGF- $\beta$ 1含浸コラーゲンスポンジを、6週齢、メスのddY:Stdマウス背部皮下に埋入した。埋入は、各実験条件につき3個体ずつ行った。コントロールとして<sup>125</sup>I 標識TGF- $\beta$ 1水溶液を皮下投与した。経時的にジエチルエーテル全身麻酔下、心臓よりの全血採集により犠牲死させ、残存したコラーゲンスポンジ及びその周囲の組織液、あるいは背部の皮膚全層を採集し、それぞれ放射活性を測定した。水溶液投与実験群に対しても、投与部位における組織成分を同様に採取し、その放射活性を測定した。埋入試料の放射活性を100として、残存したコラーゲンスポンジ及び組織中の放射活性をパーセント表示(残存率で表示)し、TGF- $\beta$ 1のin vivoにおける徐放曲線を作成した。その結果を図1に示す。尚、同図において、凡例に示した数値は、例1に記載の熱架橋処理の時間である(図2も同

様)。

【0032】コントロール群(図示せず)では、わずか1日間で、TGF- $\beta$ 1の放射活性がその投与部位からほとんど消失してしまったが、コラーゲンスポンジに含浸して埋入した場合には、TGF- $\beta$ 1の放射活性が長期間検出され、TGF- $\beta$ 1の放出が in vivo で徐放化されていることがわかる。また、その徐放期間は、熱架橋時間の増加とともに延長されていることがわかる。

#### 【0033】例3

安全キャビネット内で、ボルトンハンター試薬(BHR)ベンゼン溶液に乾燥窒素ガスを吹き込みベンゼンを蒸発させ、BHRを乾固させた。このBHRに蒸留水を加え溶解した。例1において作製した各コラーゲンスポンジ(約1mg、直径6mm、厚さ3mm、EOG滅菌済み)にBHR水溶液を10 $\mu$ lずつ滴下、一晩、4℃に放置し、コラーゲンスポンジを<sup>125</sup>I 標識した。得られた<sup>125</sup>I 標識コラーゲンスポンジを蒸留水で複数回洗浄し、未反応のBHRを除去した。次に、<sup>125</sup>I 標識コラーゲンスポンジを例1と同様の条件で凍結乾燥した。その後、10 $\mu$ lの0.05Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を乾燥スポンジに滴下、4℃で一晩静置することによってコラーゲンスポンジを再膨潤させた。得られた<sup>125</sup>I 標識コラーゲンスポンジをddY:Stdマウス(メス)の背部皮下に埋入した。埋入は、各実験条件につき3個体ずつ行った。例2と同様に、経時的に犠牲死させ、残存したコラーゲンスポンジ及びその周囲の組織液、あるいは背部の皮膚全層を採集し、それぞれ放射活性を測定した。埋入試料の放射活性を100として、残存したコラーゲンスポンジ及び組織中の放射活性をパーセント表示(残存率で表示)し、in vivoにおけるコラーゲンスポンジの分解曲線を作成した。その結果を図2に示す。

【0034】架橋時間に関係なく、いずれのコラーゲンスポンジも時間とともに体内で分解された。しかしながら、その分解期間は架橋時間の増加とともに延長されている。これは、例2のTGF- $\beta$ 1の徐放実験と同じ傾向であった。同じ架橋時間のコラーゲンについて、TGF- $\beta$ 1の残存放射活性とコラーゲン自身の残存放射活性の時間変化を比較すると、その両者はよく対応していることがわかる。この結果は、体内において、TGF- $\beta$ 1がコラーゲンスポンジから単純拡散によって放出されているのではなく、コラーゲンの分解とともにTGF- $\beta$ 1が放出されていることを示している。このように、本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体によれば、TGF- $\beta$ 1の徐放期間をコラーゲンの分解性のみによってコントロールできることがわかる。

#### 【0035】例4

例1にて作製した熱架橋コラーゲンスポンジシート(熱架橋時間:12時間、厚さ約1mm)から、直径6mmのディスクをポンチとはさみで切り出した。これをポリスチレン製培養皿に移し、エチレンオキシドガス滅菌にかけ

た。次に、コラーゲンスポンジディスクを2枚重ねにし、該コラーゲンスポンジディスク上に $5.0 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 濃度のヒト遺伝子組み替え型 $\text{TGF-}\beta 1/\text{PBS}$ を $20 \mu\text{l}$ ずつ( $0.1 \mu\text{gTGF-}\beta 1$ )滴下した。 $4^\circ\text{C}$ で一昼夜静置し、 $\text{TGF-}\beta 1$ をコラーゲンスポンジディスクに含浸させた( $\text{TGF-}\beta 1/\text{コラーゲン}$ )。尚、コントロールとして、 $\text{PBS } 20 \mu\text{l}$ のみを含浸させたコラーゲンスポンジディスクを調製した( $\text{PBS}/\text{コラーゲン}$ )。ネブタールで全身麻酔した日本白色兎(オス、 $2\text{--}2.5 \text{ kg}$ )の頭部を、バリカンで剃毛した後、イソジンで消毒し、キシロカインで局所麻酔をかけた。頭頂部の皮膚を正中切開し、骨膜を剥離、切開した。露出した頭蓋骨頭頂部を冷却(生理食塩水をかける)しつつ、デンタルドリルで直径 $6 \text{ mm}$ の骨欠損孔(硬膜は保存)を矢状縫合の左右対称に1つつつ作製した。この骨欠損部へ $\text{TGF-}\beta 1$ 含浸コラーゲンスポンジディスクを挿入し、骨膜を4-0ナイロン糸で、皮膚を2-0絹糸でそれぞれ縫合した。術後6週間で、ネブタールにより麻酔死させ、欠損部を含む骨を切り出した。取り出した骨試料を軟X線撮影した。次にホルマリンによる固定、脱灰を行い、組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色した後、光学顕微鏡にて観察した。その結果を図3～6に示す。

【0036】軟X線撮影では、 $\text{TGF-}\beta 1/\text{コラーゲン}$ 群の骨欠損部においてのみ、X線不透過像が得られ、骨欠損部が修復されていることがわかった。組織切片観察から、 $\text{TGF-}\beta 1/\text{コラーゲン}$ 群では、骨欠損部が再生した骨組織によって修復されていることが明らかとなった(この時点では、コラーゲンスポンジは分解していた)。 $\text{TGF-}\beta 1$ 水溶液投与群(コラーゲンスポンジは使用せず、骨欠損部に $\text{TGF-}\beta 1$ を $0.1 \mu\text{g}$ 含む $\text{PBS } 20 \mu\text{l}$ を直接滴下したもの)では、このような骨再生は見られず、骨欠損部には軟組織の侵入が見られた。このような組織像は、 $\text{PBS}/\text{コラーゲン}$ 群は勿論、無処理群(コラーゲンスポンジは勿論、 $\text{TGF-}\beta 1$ も $\text{PBS}$ も使用せず)も同様であった。これらの結果は、コラーゲンスポンジの分解とともに徐放された $\text{TGF-}\beta 1$ が生物活性をもっていることを示している。

#### 【0037】

【発明の効果】本発明の方法によれば、生理活性ペプチドと水不溶性のコラーゲン体との間の物理的結合によって生理活性ペプチドの徐放性を有するコラーゲン成形体

が形成される。生理活性ペプチドの放出はコラーゲン自身の生体内での分解によって制御されるため、従来の徐放製剤に見られるような製剤中における生理活性ペプチドの単純拡散による徐放あるいは水溶性高分子を用いた一過性の生理活性ペプチドの体内での滞留性の延長などに比べ、より緻密な放出速度の制御が可能となる。また、より長期間にわたる放出、徐放性が向上する。また、本発明の生理活性ペプチド徐放性コラーゲン成形体においては、該コラーゲン成形体が水不溶性であるため、生理活性ペプチドが該コラーゲン成形体内にある限り、生体内での分解から防御されているので、その活性を保持させることができる。さらに、コラーゲンの架橋程度によって、生理活性ペプチドの放出が制御されるため、放出速度は一定であり、製剤化にあたりその形状に特に注意を払う必要がなくなる。尚、生理活性ペプチドが徐放されることから、活性を示すための投与量の低用量化が実現され、目的とする部位以外への作用による副作用を低減し得る。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 $\text{TGF-}\beta 1$ 含浸コラーゲンスポンジをマウス背部皮下に埋入した後のコラーゲンスポンジ中の $\text{TGF-}\beta 1$ の残存性を調べた結果を示すグラフである。

【図2】 $\text{TGF-}\beta 1$ 含浸コラーゲンスポンジをマウス背部皮下に埋入した後のコラーゲンスポンジの生体内での残存性を調べた結果を示す図である。

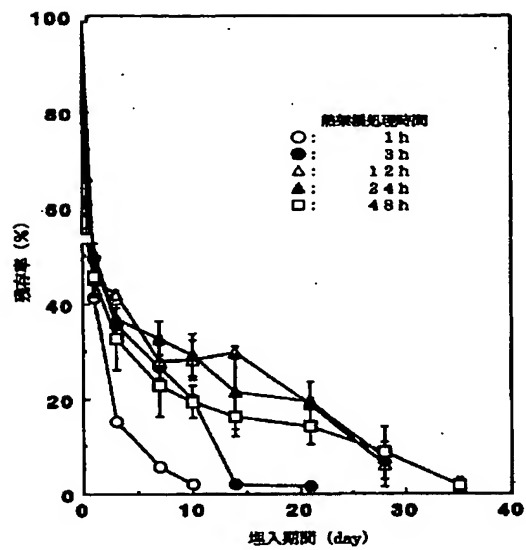
【図3】 $\text{TGF-}\beta 1$ 含浸コラーゲンスポンジをウサギ頭蓋骨欠損部に埋入した( $\text{TGF-}\beta 1/\text{コラーゲン}$ 群)後の欠損部の組織切片の光学顕微鏡観察結果を示す図面代用写真である。

【図4】 $\text{PBS}$ 含浸コラーゲンスポンジをウサギ頭蓋骨欠損部に埋入した( $\text{PBS}/\text{コラーゲン}$ 群)後の欠損部の組織切片の光学顕微鏡観察結果を示す図面代用写真である。

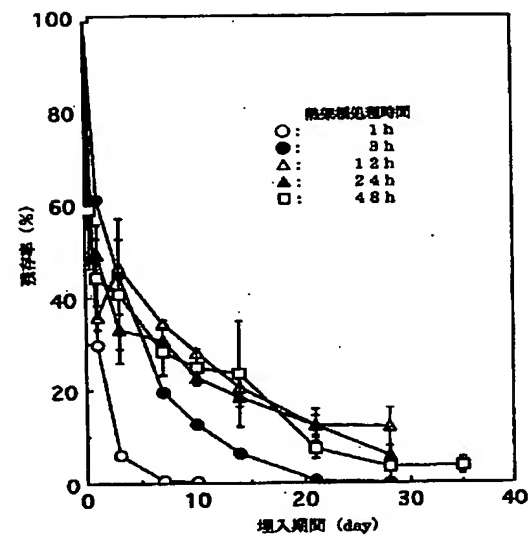
【図5】 $\text{TGF-}\beta 1$ の $\text{PBS}$ 溶液をウサギ頭蓋骨欠損部に直接投与した( $\text{TGF-}\beta 1$ 水溶液投与群)後の欠損部の組織切片の光学顕微鏡観察結果を示す図面代用写真である。

【図6】無処理群(コラーゲンスポンジは勿論、 $\text{TGF-}\beta 1$ も $\text{PBS}$ も使用せず)のウサギ頭蓋骨欠損部の組織切片の光学顕微鏡観察結果を示す図面代用写真である。

【図1】



【図2】

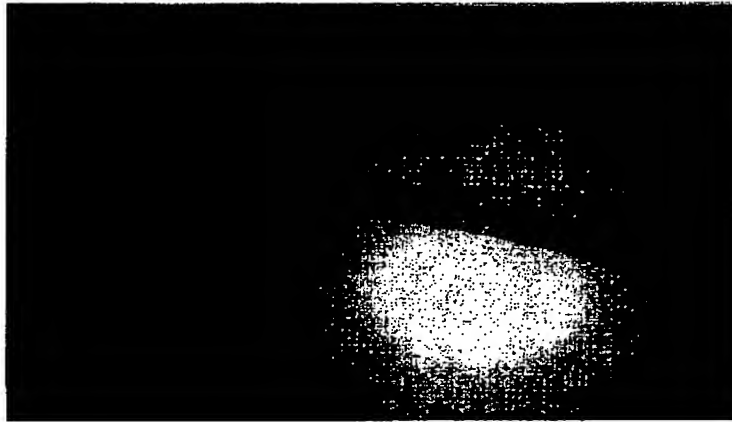


【図3】

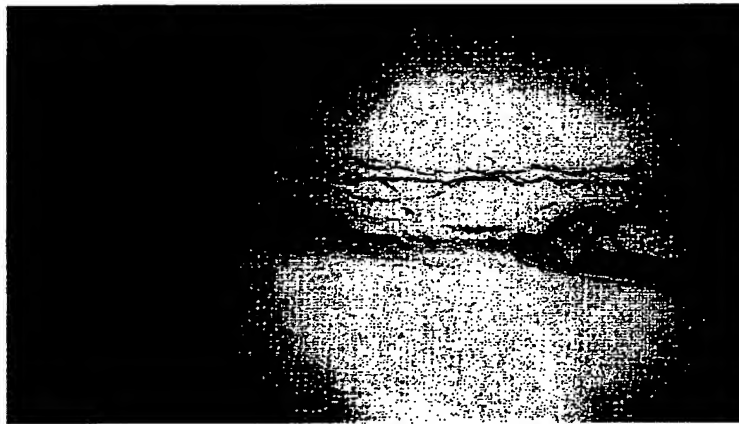




【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターム(参考)
C 0 7 K	14/17	A 6 1 K	37/02
	14/52		37/24
(72)発明者	中村 達雄	F ターム(参考)	4C076 AA94 BB21 CC26 EE41M
	京都府京都市左京区吉田神楽岡町46-10		FF31 GG07
(72)発明者	上田 寛樹		4C084 AA03 BA44 DA01 DA12 DA25
	京都府京都市左京区下鴨岸本町61		DB53 DB54 DB59 DB60 DB61
			DB62 DC24 MA34 MA55 NA12
			ZB212
			4H045 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01
			DA22 EA28 FA50 FA83

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**